

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591777

研究課題名 (和文) 酸素分圧の骨組織への影響とそのメカニズムの解明

研究課題名 (英文) Implication of Oxygen Tension in Bone Metabolism

研究代表者

橋本 淳 (HASHIMOTO JUN)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40237938

研究成果の概要 (和文)：

高い酸素分圧が破骨細胞の長期生存・維持をもたらすことを明らかとした。炎症・腫瘍に伴う血管新生により血流増加、高酸素分圧の環境で破骨細胞が多く出現し骨破壊が増加している臨床像を説明する一病態の解明と考える。その機序として、M-CSF, c-fms という破骨細胞前駆細胞の維持に関わる物質の発現を介していることを示した。一方、酸素分圧の培養細胞への影響を見る際には、培養液量、液の深さも含む繊細な条件設定が必要であることを明らかとした。

研究成果の概要 (英文)：

We showed that a high oxygen tension markedly prolonged the duration of osteoclast precursor formation in the presence of supporting cells, and also markedly and persistently increased the production of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) by supporting cells. These findings could explain some part of pathophysiology in severe bone destruction or osteolysis accompanied with abundant blood vessel and numerous osteoclasts seen in several pathological conditions such as rheumatoid arthritis (RA) and primary or metastatic tumors. We also showed that O_2 concentrations decreased depending of the depth in both 20 and 5% O_2 tension, so medium depth is one of critical conditions to study the relation of the cellular environment of pericellular oxygen tension and cell biology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

加齢とともに生ずる、変形性関節症、変形性脊椎症、骨粗鬆症はいずれも加齢とともに上昇する酸化ストレスが病態と関与している。また、変形性関節症の病態には軟骨細胞機能、骨粗鬆症の病態には関与する骨芽細胞、骨細

胞、破骨細胞の機能変化が関与している。この軟骨細胞、骨細胞いずれに対しても酸素濃度環境が重要な影響を持つことをこれまでに我々は証明してきた (Hirao M, J Biol Chem 2006, Hirao M, J Bone Miner Metab 2007)。

2. 研究の目的

本研究ではさらに骨の細胞が生態内環境因子の一つである酸素分圧によりどのような機能変化を生ずるかを明らかとして、普遍的な生態内環境から生ずる骨の臨床的な障害に対する治療対応策を模索する。

3. 研究の方法

A. 破骨細胞に対する酸素分圧の影響の検討：破骨細胞前駆細胞である CD14 陽性細胞と、骨芽細胞様細胞である SaOS4/3 細胞との共培養による破骨細胞分化誘導の系を用いて、破骨細胞の維持、分化に対する酸素分圧の影響を評価する。

B. 生体内での組織内酸素濃度と、細胞培養の実験系での培養細胞近傍の酸素濃度の比較検討を行い、培養実験を行う上での正確な実験条件の設定を行う基礎データを得る。

4. 研究成果

A. 破骨細胞前駆細胞である CD14 陽性細胞と、骨芽細胞様細胞である SaOS4/3 細胞との共培養において、形成された破骨細胞が高酸素濃度下では長期にわたって生存することを確認した (図 1)。また、高酸素濃度下では CD14 陽性細胞における c-fms の発現が上昇する一方、SaOS4/3 細胞においてそのリガンドである M-CSF の発現が上昇していた (図 2)。さらに、組織中で M-CSF 発現細胞と TRAP 陽性破骨細胞の局在が一致し、同部位で ROS の発現が高いことも確認され、局所の高酸素濃度が破骨細胞の形成および生存を促進することが強く示唆された。

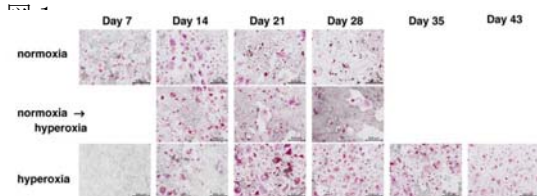
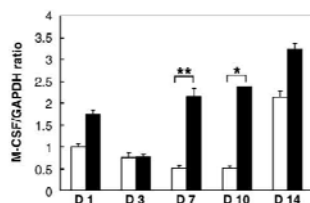


図 2



B. 実際の生体における組織中の酸素濃度を、家兔の筋肉組織ならびに関節内で測定した。次に骨芽細胞前駆細胞である MC3T3-E1 細胞を、通常の 20%あるいは5%の二通りの酸素濃度で、またメディアム量を 5ml あるいは 2ml

の二通りで培養し、培養上清中の酸素濃度をシャーレ底面すなわち培養している細胞からの距離ごとに酸素濃度測定記録計を用いて測定した。その結果、酸素濃度は表面から下に行くほど、すなわち培養細胞に近づくほど低くなったが、その変化はメディアム量が 5ml のときに顕著であった。また、培養細胞近傍の酸素濃度は 5%の低酸素濃度で培養したときのほうが先の生体組織内で測定した酸素濃度に近く、実際の生体内の環境を再現していると考えられた。さらに他の間葉系細胞の培養においても同様の結果が認められた。酸素分圧をかえた in vitro の研究を行う上で、培養液の量の調整による深さのコントロールが極めて重要な実験条件であることが明らかとなった。これまでの、多くの研究はこの条件設定は統一されておらず、この分野の研究を行う上での重要な点である。このような条件設定を正確に行い、骨細胞に対する酸素分圧の影響の細胞内転写因子の動きの検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Hashimoto J, Garnero P, van der Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, Nishimoto N. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody (TOCILIZUMAB) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography and BMI: data from the SAMURAI study. *Mod Rheumatol*. 2011 Feb;21(1):10-5 査読有
2. Igarashi H, Hashimoto J, Tomita T, Yoshikawa H, Ishihara K. TP53 mutations coincide with the ectopic expression of activation-induced cytidine deaminase in the fibroblast-like synoviocytes derived from a fraction of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2010 ;161(1):71-80. 査読有
3. Ebina K, Fukuhara A, Ando W, Hirao M, Koga T, Oshima T, Matsuda M, Maeda K, Nakamura T, Ochi T, Shimomura I, Yoshikawa H, Hashimoto J. Serum adiponectin concentrations correlate with severity of rheumatoid arthritis

evaluated by extent of joint destruction. *Clinical Rheumatology* 2009 28(4):445-51. 査読有

4. Yamasaki N, Tsuboi H, Hirao M, Nampei A, Yoshikawa H, Hashimoto J. High oxygen tension prolongs the survival of osteoclast precursors via macrophage colony-stimulating factor. *Bone*. 2009; 44(1):71-79. 査読有
5. Ebina K, Oshima K, Matsuda M, Fukuhara A, Maeda K, Kihara S, Hashimoto J, Ochi T, Banda NK, Yoshikawa H, Shimomura I. Adenovirus-mediated gene transfer of adiponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 378, 186-191, 2009. 査読有
6. Hirao M, Hashimoto J, Tsuboi H, Nampei A, Nakahara H, Yoshio N, Mima T, Yoshikawa H, Nishimoto N. Laboratory and febrile features after joint surgery in rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab. *Ann Rheum Dis*. 2009 ;68(5):654-7. 査読有
7. Hashimoto J, Garnero P, van der Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, Nishimoto N. A combination of biochemical markers of cartilage and bone turnover, radiographic damage and body mass index to predict the progression of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis treated with disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Mod Rheumatol*. 2009;19(3):273-82. 査読有
8. Take Y, Nakata K, Hashimoto J, Tsuboi H, Nishimoto N, Ochi T, Yoshikawa H. Specifically modified osteopontin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes supports interaction with B cells and enhances production of interleukin-6. *Arthritis Rheum*. 2009 Dec;60(12):3591-601. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 37th European Symposium on Calcified Tissues 2010/6/27 Pericellular Oxygen Concentration in Osteoblast Culture. H. Oze, Hirao M, Nampei A, Shi K, Yoshikawa H, Hashimoto J.

2. 37th European Symposium on Calcified Tissues 2010/6/27 Adenovirus-mediated Gene Transfer of Adiponectin Reduces Osteoclasts Differentiation and Bone Erosion of Collagen-Induced Arthritis in Mice. K. Ebina, K. Oshima, Hirao M, Hashimoto J, Ochi T, Yoshikawa H, Shimomura I.
3. Annual European Congress of Rheumatology 2009 2009/6/10 Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis (RA) Patients with Tocilizumab Treatment. Hirao M, Yamasaki N, Oze H, Ebina K, Nampei A, Kawato, Y, Yoshikawa H, Nishimoto N, Hashimoto J.
4. Annual European Congress of Rheumatology 2009 2009/6/10 Morphological Appearance of Distal Tibia in Patients with Rheumatoid Arthritis. Nampei A, Hirao M, Shi K, Sugamoto K, Yoshikawa H, Hashimoto J.
5. Annual European Congress of Rheumatology 2009 2009/6/10 Adenovirus-mediated Gene Transfer of Adiponectin Reduces The Severity of Collagen-induced Arthritis in Mice. Ebina K, Oshima K, Fukuhara A, Matsuda M, Hirao M, Nampei A, Hashimoto J, Yoshikawa H, Shimomura I
6. 36th European Symposium on Calcified Tissues 2009/5/23 NKX3.2 is an Important Mediator of Hypoxia-Induced Chondrocytic Differentiation. Kawato Y, Hirao M, Hashimoto J, Tamai T, Yamasaki Y, Nampei A, Myoui A, Yoshikawa H

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 淳 (HASHIMOTO JUN)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：40237938

(2) 研究分担者

吉川秀樹 (YOSHIKAWA HIDEKI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60191558
名井 陽 (MYOUI AKIRA)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10263261
史 賢林 (SHI KENRIN)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：60575893

平尾 眞 (HIRAO MAKOTO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：10527708

(3)連携研究者
なし